

Leevi Virkkula

REKOMBINANTTISET SPIDROIINIT

Kandidaatintyö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Suvi Santala
Helmikuu 2023

TIIVISTELMÄ

Leevi Virkkula: Rekombinantitiset spidroiinit
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Tekniikan ja luonnontieteiden TkK-tutkinto-ohjelma, ympäristö- ja energiatekniikka
Helmikuu 2023

Rekombinantitiset spidroiinit ovat hämähäkinseinin proteiineja mukailevia kuitumaisia sitkeitä proteiineja, jotka on tuotettu geenimuunnelluissa organismeissa. Tässä työssä tarkastellaan suurien ampullispidroiinien rekombinanttisen tuotannon ongelmia teollisen mittakaavan tuotannossa sekä niiden sovelluksia ja mahdollisuuksia. Rekombinanttisten proteiinien tuotanto on tärkeä ja kasvava teollisuuden osa-alue. Spidroiinit ovat mekaanisten ominaisuuksiensa ja sovelluskohteidensa vuoksi erityisen kiinnostavia teollisuuden kannalta.

Työ on kirjallisuuskatsaus vertaisarvioituista tutkimuksista ja artikkeleista. Työssä teorian osuus jakautuu yleiseen spidroiinien rakenteeseen sekä suurten ampullispidroiinien rakenteeseen ja ominaisuuksiin. Suurten ampullispidroiinien rakenne ja ominaisuudet ovat muokattavissa, mikä laajentaa niiden tutkimus- ja sovellusmahdollisuuksia

Rekombinanttisen tuotannon luvussa käsitellään vaiheet ja ongelmat rekombinanttisten spidroiinien tuotantosysteemeissä aina valmiiseen tuotteeseen asti. Työn tuotantosysteemi koostuu rekombinanttisten spidroiinien tuotannosta ja jälkikäsittelystä eli keräyksestä, puhdistuksesta ja kudonnasta. Työssä käy ilme, että spidroiinien sekvenssin toistuvuus ja suuri koko aiheuttavat suuren rasituksen soluille, mistä seuraa spidroiinien pieni ilmennys ja saanto. Saantoa parantavia toimia ovat induktiolämpötilan lasku, kodonioptimointi ja tRNA saatavuuden parantaminen. Jälkikäsittelyssä lopullinen saanto on vahvasti riippuvainen puhdistuksesta. Valittujen spidroiinien geenien lisäksi biomimeettisen kudonnan on havaittu olevan erityisen tärkeä toimenpide haluttujen mekaanisten ominaisuuksien saavuttamiseksi.

Viimeisessä osiossa ennen johtopäätöksiä käsitellään spidroiinien sovelluksia ja teollisen mittakaavan tuotantoa. Muutamista jo kaupallistetuista tuotteista huolimatta spidroiinien käyttökohteet ovat vielä kehitysvaiheessa. Tulevaisuuden sovellukset ovat kuitenkin lupaavia. Uniikkien ominaisuuksien vuoksi niitä pyritään kehittämään kohti teollista mittakaavaa. Teollisen tuotannon ongelmina ovat alhaisesta saannosta syntyvät korkeat kustannukset. Toisaalta indusoija, antibiootit sekä puhdistusmenetelmät tuottavat huomattavan osan kustannuksista, joita optimoimalla tai vaihtamalla voidaan pyrkiä laskemaan kuluja, mikäli tuotantoa ei saada kehitettyä tarpeeksi.

Kaiken kaikkiaan rekombinanttisten spidroiinien tuotanto ja sovellukset ovat kehittyneet viime vuosikymmenen aikana huomattavasti. Optimoimalla tuotanto-organismeja ja osaprosesseja voidaan saavuttaa teollisen mittakaavan tuotanto tulevaisuudessa.

Avainsanat: Rekombinanttinen, spidroiini, biomimeettinen, saanto, teollinen mittakaava, induktiolämpötila

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ABSTRACT

Leevi Virkkula: Recombinant spidroins
Bachelor's thesis
Tampere University
Technology and natural sciences B. Sc. degree, environment and energy engineering
February 2023

Recombinant spidroins are tough fibroin proteins that mimic spider silk proteins and are produced in genetically modified organisms. This bachelor's thesis reviews major ampullate spidroin applications, possibilities and industrial scale production problems. Recombinant protein production is important and growing branch of industry. Spidroins are particularly interesting for industry due to their mechanical properties and applications.

This thesis is a literature review of peer-reviewed studies and articles. Theory is divided into the general structure of spidroins and to the structure and properties of major ampullate spidroins. Major ampullate spidroins' structure and properties can be modified which expands their research and application possibilities.

The chapter on recombinant production discusses the stages and problems in the production systems of recombinant spidroins up to the finished product. The production system consists of the production and post-processing of recombinant spidroins, i.e. collection, purification and weaving. The thesis shows that the repetition and the large size of the spidroin sequence cause a great stress on the cells, resulting in a low expression and yield of spidroins. Actions that improve yield include lowering the induction temperature, codon optimization and improving tRNA availability. In the post-processing, the final yield is strongly dependent on the purification. In addition to the genes of the selected spidroins, biomimetic weaving has been found to be a particularly important measure to achieve the desired mechanical properties.

The last section before the conclusions discusses the applications and industrial scale production of spidroins. Despite a few already commercialized products, the applications of spidroins are still in the development phase. However, future applications are promising. Due to their unique properties, efforts are being made to develop them towards an industrial scale. The problems of industrial production are high costs arising from low yields. On the other hand, the inducer, antibiotics and cleaning methods produce a significant part of the costs, which can be optimized or changed to reduce costs if production cannot be developed enough.

Overall, the production and applications of recombinant spidroins have advanced considerably over the past decade. By optimizing production organisms and sub-processes, industrial-scale production can be achieved in the future.

Keywords: Recombinant, spidroin, biomimetic, yield, industrial scale, induction temperature

The originality of this thesis has been checked using the Turnitin OriginalityCheck service.

ALKUSANAT

Tämä työ on tehty mielenkiinnosta uniikkeja luonnon molekyyliä ja synteettistä biologiaa kohtaan. Työn sisältö yhdistää biotekniikan, biologian ja materiaalitekniikan ja antaa mahdollisuuden työskennellä mieluisten aiheiden parissa.

Haluan kiittää ohjaajaani Suvi Santalaa avusta ja kärsivällisyydestä työn aikana.

Tampereella, 6.2.2023

Leevi Virkkula

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. SPIDROIINIEN RAKENNE JA OMINAISUUDET	2
2.1 Spidroiinien yleinen rakenne	2
2.2 MaSp1:n ja MaSp2:n rakenne ja ominaisuudet	4
3. REKOMBINANTTISTEN SPIDROIINIEN TUOTANTO	7
3.1 Rekombinantitiset tuotantosysteemit	7
3.2 Keräys, puhdistus ja kudonta	12
4. REKOMBINANTTISTEN SPIDROIINIEN SOVELLUKSET	15
4.1 Markkinoilla olevat sovellukset	15
4.2 Teollisen mittakaavan tuotanto	16
5. JOHTOPÄÄTÖKSET	19
LÄHTEET	20

KUVALUETTELO

Kuva 1: Havainnollistus spidroiinien rakenteesta.

Kuva 2: Hämähäkin silkkirauhasen yksinkertaistettu rakenne.

Kuva 3: Havainnollistus eri hämähäkkilajien MaSp1:n ja MaSp2:n konservoitujen motiivien ja aminohappojen välisistä vaihtelevuuksista ja samankaltaisuuksista. (LH, *Latrodectus hesperus*, NC, *Nephila clavipes*, AD, *Araneus diadematus*, AB, *Argiope bruennichi*, EA, *Euprosthops australis*).

Kuva 4: Teräksen ja erilaisten kuitujen mekaanisia ominaisuuksia.

Kuva 5: 96 monomeeriä sisältävän spidroinin valmistukseen käytetty vektori.

Kuva 6: Ilmennysvektori, johon ei vielä ole liitetty spidroinin geeniä.

Kuva 7: Yksinkertainen malli märkäkudonnasta.

Kuva 8: Pioneeritehtaassa rekombinanttisten spidroiinien kilohinnan muodostuminen valmistusprosessin eri osissa.

Kuva 9: Rekombinanttisen spidroinin kilohinta proteiinin ilmennyksen funktiona eri tehdasasetelmissä.

LYHENTEET JA MERKINNÄT

MaSp	engl. major ampullate spidroin, suuri ampullispidroiini
(A) _n	polyalaniini
(GX) _n	glysiiniX
GGX	glysiini-glysiiniX
GPGXX	glysiini-proliini-glysiiniXX
SS	seriini-seriini
QQ	glutamiini-glutamiini
X	mikä tahansa alla mainituista aminohapoista
A	alaniini
S	seriini
Y	tyrosiini
N	asparagiini
Q	glutamiini
R	arginiini
P	proliini
L	leusiini
F	fenyylialaniini
D	asparagiinihappo
T3SS	engl. type 3 secretion system, tyypin 3 erityys systeemi
IPTG	isopropyli-β-D-1-thiogalaktopyranosidi
SHMT	seriini hydroksymetyylitransferaasi

1. JOHDANTO

Hämähäkit ovat olleet maapallolla jo lähes 400 miljoonaa vuotta. Niiden kehruurauhaset tuottavat seittiä tai silkkiä, joka koostuu erilaisista pitkistä hämähäkinseittiproteiineista eli spidroineista [1]. Muita tunnettuja silkin tuottajia ovat muun muassa silkkiperhonen *Bombyx mori*, jonka silkkiä voidaan viljellä suhteellisen vaivattomasti. Hämähäkinseitien viljeleminen on huomattavasti silkkiperhosia monimutkaisempaa hämähäkien vihamielisen käyttäytymisen ja seitin erittäin pienen saannon seurauksena. Tästä ongelmasta huolimatta ihmiset ovat pyrkineet hyödyntämään seittiä omiin tarpeisiinsa, sillä sen mekaaniset ominaisuudet ovat erinomaiset jopa synteettisiin kuituihin verrattuna. Jokaisella hämähäkilajilla on kuitenkin monia erilaisia ja erilaisiin tarkoituksiin sopivia seittejä. Siten myös niiden ominaisuudet vaihtelevat huomattavasti. Sitkeimmillään hämähäkinseitit ovat jopa 300 % sitkeämpiä kuin luotiliiveissä käytetty synteettisesti valmistettu Kevlar [2].

2000-luvulla on siirrytty luonnollisten seittien keräämisestä rekombinanttiseen spidroiinin tuotantoon ja kudontaan sen paremman kannattavuuden ja muokkausmahdollisuuksien vuoksi. Rekombinanttiset spidroiinit tarkoittavat hämähäkinseitien proteiineja matkivia proteiineja, jotka on tuotettu geenimuokatuissa organismeissa. Mekaanisten ominaisuuksien lisäksi rekombinanttisen seittiproteiinin vegaanisuus, biohajoavuus ja keveys kiinnostavat tutkijoita [3]. Lähiaikoina silkin mahdollisista antimikrobiallisista ominaisuuksista on herännyt keskustelua, vaikkakin lukuisten edellisten tutkimusten mukaan silkillä on antimikrobisia ominaisuuksia. [4], [5] Mahdolliset sovelluskohteet vaihtelevat lääkeaineiden kuljetuksesta materiaalien kuten tekstiilien valmistukseen. Hämähäkin seitti on myös yksi ainoista ohuista materiaaleista, jota voidaan käyttää inertiafuusiossa sen ominaisuuksien säilyessä kryogeenisissäkin olosuhteissa [6].

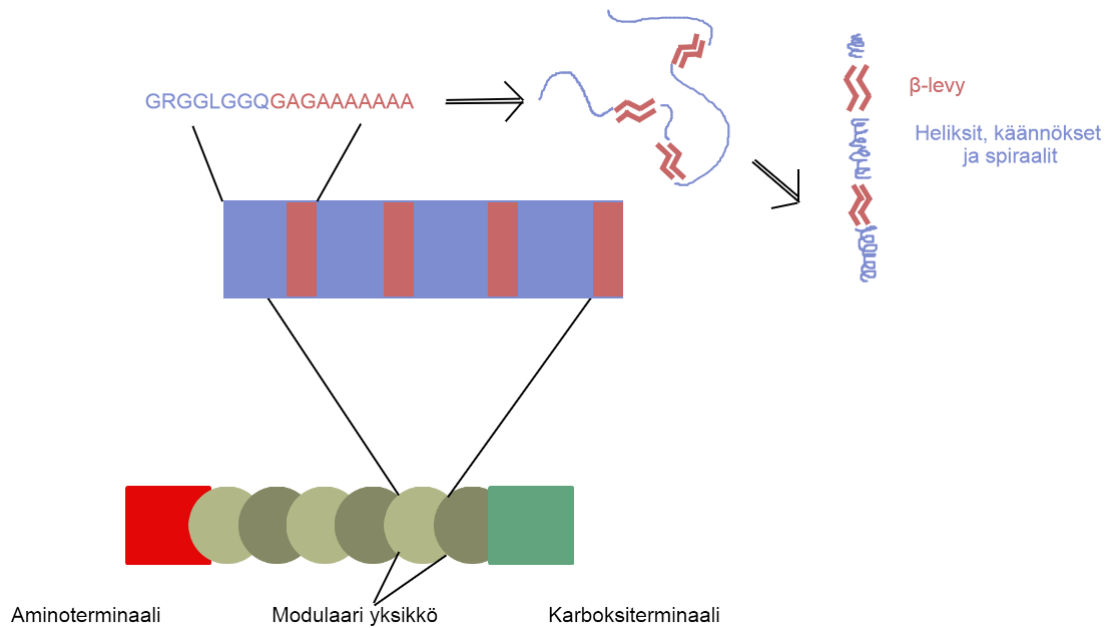
Kandidaatintyön tavoitteena on tarkastella rekombinanttisten spidroiinien tuotantoa, kannattavuutta sekä sovelluksia. Kokonaisuus on rajattu pelkästään mikrobeilla tuotettuihin spidroiineihin. Työ alkaa spidroiinien teoreettisesta taustasta ja etenee tuotannon eri vaiheiden läpi. Tuotantoa seuraavat sovellukset ja johtopäätökset.

2. SPIDROIINIEN RAKENNE JA OMINAISUUDET

Spidroiinit ovat kuituproteiineja, jotka muodostavat erilaisina yhdistelminä hämähäkinseittien makrorakenteen. Tutkituimpia spidroiineja ovat suuret ampullispidroiinit (Major ampullate spidroins, MaSp). [4] Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan vain proteiineja MaSp1 ja MaSp2, jotka pääasiassa muodostavat hämähäkkien suuren ampulli seitin. Suurella ampulliseitillä on parhaat mekaaniset ominaisuudet erilaisista hämähäkinseiteistä.

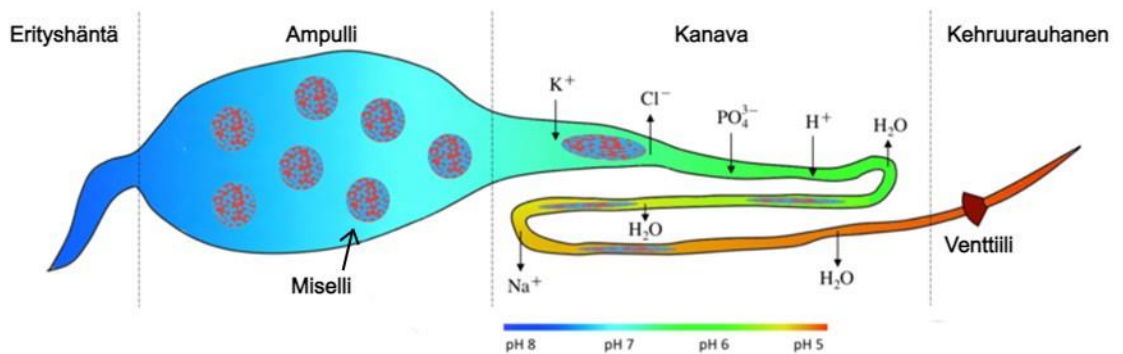
2.1 Spidroiinien yleinen rakenne

Spidroiinit ovat joukko suuria proteiineja, jotka kuuluvat samaan geeniperheeseen [7]. Niitä kaikkia yhdistää samanlainen toistuva rakenne. Näitä jopa 100 kertaa toistuvia rakenteita kutsutaan modulaareiksi yksiköiksi. Modulaarit yksiköt vuorostaan koostuvat yleensä 40–200 aminohapon muodostamista sekvenssimotiivien osajoukosta. [4] Kyseisen osajoukon selvästi yleisimmät sekvenssimotiivit ovat polyalaniini ($(A)_n$), glysiiniX ($(GX)_n$), glysiini-glysiiniX (GGX), glysiini-proliini-glysiiniXX (GPGXX), seriini-seriini (SS) ja glutamiini-glutamiini (QQ). X on alaniini (A), seriini (S), tyrosiini (Y), asparagiini (N), glutamiini (Q), arginiini (R), proliini (P), leusiini (L), fenyyialaniini (F) tai asparagiinihappo (D). Motiivien rakenteellisen tehtävän tiedetään olevan vastuussa valmiin kuidun mekaanisista ominaisuuksista. Lisäksi toistuvan rakenteen reunoilla ovat kuvan 1 tavoin noin 100 aminohapon suuruiset toistumattomat amino- ja karboksiterminaalidomeenit. [4], [8]



Kuva 1. Havainnollistus spidroiinien rakenteesta.

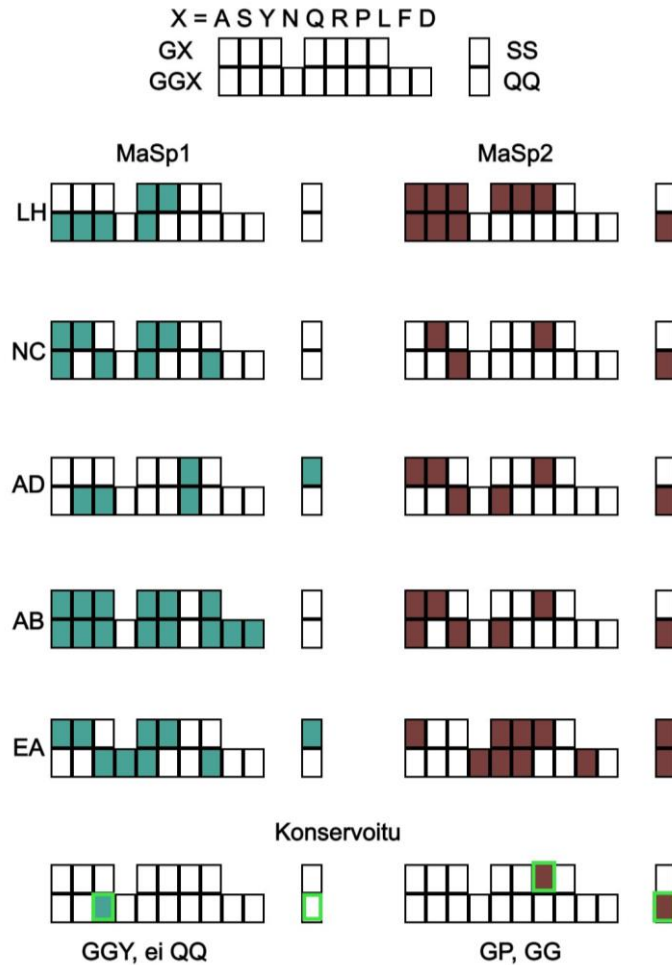
Hämähäkit tuottavat spidroiineja siihen erikoistuneissa silkkirauhasten soluissa. Itse silkkirauhasen rakenne on esitetty kuvassa 2. Karboksi- ja aminoterminaalit ovat erittäin tärkeitä kuidun muodostumisen kannalta, sillä niiden avulla spidroiinit kiinnittyvät toisiinsa ja muodostavat misellejä. Nämä misellit muodostavat seitin, kun ne ajetaan radikaalisti kapenevan kanavan läpi. Kanavaa edetessä liuoksen pH laskee, ioneja vaihdetaan ja spidroiinien massan suhde tilavuuteen kasvaa aiheuttaen kapenevan kanavan kanssa spidroiinien järjestäytymisen yhtenäiseksi kuiduksi. Ilman näitä fysikaalisia ja kemiallisia prosesseja kuidun laatu kärsisi huomattavasti.



Kuva 2. Hämähäkin silkkirauhasen yksinkertaistettu rakenne. Muokattu lähteestä [9]

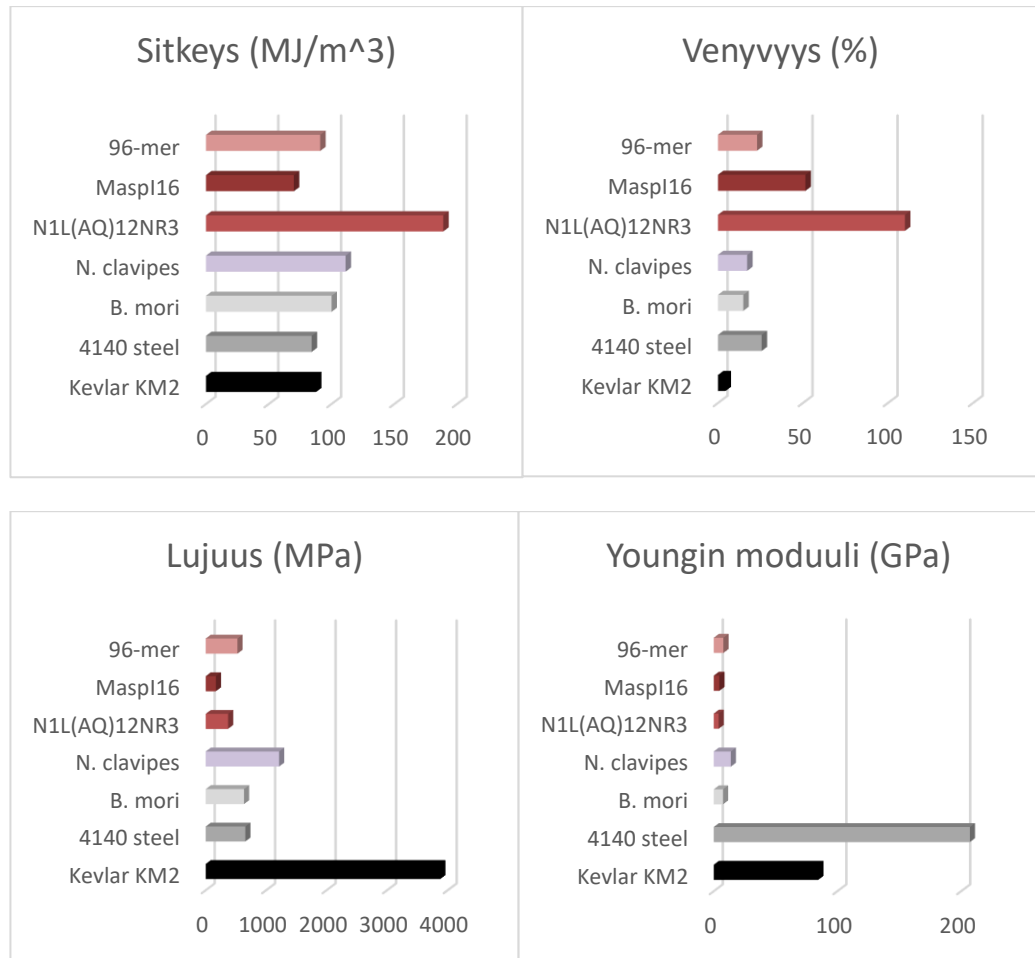
2.2 MaSp1:n ja MaSp2:n rakenne ja ominaisuudet

MaSp1:lla on korkea glysiini- ja alaniinipitoisuus. MaSp2:lla alaniinin sijasta proliinia on runsaasti GPGXX-motiivin seurauksena. $(A)_n$ ja $(GX)_n$ muodostavat β -levyistä kristallisia rakenteita, jotka liittävät eri proteiinimolekyylit yhteen antaen seitille suuren vetolujuuden. Tosin $(GX)_n$:n glysiini huonontaa sen β -levyjen hydrofobista vuorovaikutuskykyä verrattuna erittäin hydrofobiseen $(A)_n$ -motiiviin ja laskee siten sen sidosenergiaa, mikä johtaa alhaisempaan vetolujuuteen [10]. GGX:n uskotaan muodostavan 3_{10} -heliksin, koska se koostuu pääasiassa amorfisemmista glysiinirikkaista alueista. Fourier-muunnosta käytävällä infrapunaspektroskopialla ja ydinmagneettisella resonanssilla on saatu dataa, joka tukee hypoteesiä 3_{10} -heliksin muodostumisesta ja toiminnasta siirtymäalueena muiden rakenneosien välillä [4]. Glysiinirikkailla motiiveilla on tapana esiintyä amorfisempina rakenteina antaen hämähäkinseitille suuren sitkeyden. GPGXX on ominainen pääasiassa vain MaSp2:lle ja sen sekundaarirakenne muodostaa elastisen β -spiraalin tai β -käännöksen. QQ-motiivien arvellaan toimivan seitin molekyylien välisten sidosten muodostajina ja kerääjinä. [11], [12] Kaikki motiivit muodostavat myös satunnaisia vyyhtejä. Motiivien suhteellinen osuus niin eri lajeissa kuin saman lajin yksilöissä on hyvin vaihtelevaa kuten kuvasta 3 nähdään, mutta yllä mainitut motiivit ovat yleisimpiä. [12]



Kuva 3. Havainnollistus eri hämähäkkilajien MaSp1:n ja MaSp2:n konservoitujen motiivien ja aminohappojen välisistä vaihtelevuuksista ja samankaltaisuuksista. (LH, *Latrodectus hesperus*, NC, *Nephila clavipes*, AD, *Araneus diadematus*, AB, *Argiope bruennichi*, EA, *Euprosthrops australis*). Muokattu lähteestä [12]

Spidroiinien motiivien suhteellisen osuuden vaihtelevuuden takia myös niiden ominaisuudet vaihtelevat laajasti. Tärkeimpiin mekaanisiin ominaisuuksiin kuuluvat venyvyys, lujuus, Youngin moduuli ja erityisesti sitkeys. Sitkeys on materiaalin kyky vastaanottaa energiaa plastisesti murtumatta, mikä joidenkin hämähäkkilajien silkillä on suurempi kuin millään tunnetulla kuidulla. Lujuus taas on materiaalin kyky kestää siihen kohdistettua rasitusta murtumatta ja plastisesti muovautumatta. Kuvaan 4 on kerätty mekaanisia ominaisuuksia muutamista luonnonkuiduista ja ihmisten valmistamista materiaaleista.



Kuva 4. Teräksen ja erilaisten kuitujen mekaanisia ominaisuuksia. Perustuu lähteisiin [13]–[17]

Kuvasta 4 nähdään kuinka Kevlarin lujuus on ylivoimainen muihin vertailukohteisiin nähden. Sitkeydessä ja venyvyydessä se kuitenkin häviää selkeästi muille kuiduille. Tämän seurauksena rekombinantitiset spidroiinit ovat merkittäviä kuituja. Pitää kuitenkin huomioida, että N1L(AQ)12NR3, MaSp16 ja 96-mer ovat vielä rekombinanttisten spidroiinien kehityksen alkuvaiheessa, jolloin muun muassa niiden lujuus ja Youngin moduuli eivät yllä luonnon- ja synteettisten kuitujen tasolle.

3. REKOMBINANTTISTEN SPIDROIINIEN TUOTANTO

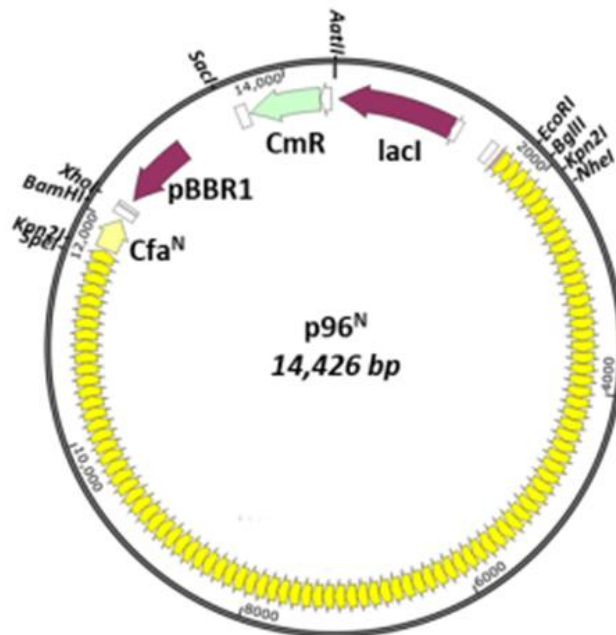
Tutkijat ovat kehittäneet viimeisten vuosikymmenien aikana keinoa tuottaa spidroineja rekombinanttisesti. Rekombinanttinen tuotanto perustuu organismien geenimuunteluun. Geenimuuntelun tarkoituksena on siirtää spidroiinia ilmentävä geeni isäntäorganismiin ja saada se tuottamaan mahdollisimman tehokkaasti rekombinanttista spidroiinia, joka voidaan kerätä ja käyttää erilaisiin sovelluksiin. Bakteereja, hiivoja, hyönteisten ja nisäkkäiden soluja sekä transgeenisia kasveja ja eläimiä on yritetty käyttää hyödyksi rekombinanttisten spidroiinien tuotannossa. Kaikilla isäntäorganismeilla haasteena on liian alhainen tiitteri tai epätoivotut mekaaniset ominaisuudet. Lupaavimpia tuloksia ja suhteellisen korkeita tiittereitä on saavutettu bakteereilla. [18]

Teollisessa mittakaavassa käytettävien mikrobien muokkaus, sopivat olosuhteet ja tehokas kasvatus ovat pitkien ja usein kalliiden projektien tuloksia. Vuonna 2010 Xia et al. saivat tuotettua rekombinanttista MaSp1:stä, jonka koko oli lähes luonnossa esiintyvän MaSp1 pituinen ja mekaaniset ominaisuudet olivat huomattavasti paremmat edeltäviin tutkimuksiin verrattuna [19]. Useimmissa tutkimuksissa tuotettavien spidroinien koko on alle 100 kDa luonnossa esiintyvien noin yli 300 kDa:n sijaan.

3.1 Rekombinanttiset tuotantosysteemit

Suuren kokonsa vuoksi spidroinien ilmentäminen sellaisenaan yksisoluisissa organismeissa on usein erittäin tehotonta tai mahdotonta [19]. Sen ja spidroinien valtavan määrän seurauksena tutkimuksissa käytettävät spidroinien geenit vaihtelevat kooltaan, aminohapoiltaan ja ominaisuuksiltaan jokaisessa tutkimuksessa. Rekombinanttisia spidroineja koskevissa tutkimuksissa on siis lähes aina eri spidroiinia ilmentävä geeni. Rekombinanttisten spidroinien geenit koostuvat muutamista kymmenistä motiiveista sekä hiili- ja typpiterminaaleista. Kyseiset geenit voivat olla jonkin hämähäkkilajin tai suvun spidroiinien konsensussekvenssejä ja kyseisiä sekvenssejä kutsutaan meereiksi. Tutkimuksissa valitaan monia erilaisia spidroineja vaihtelemalla ilmennettävien meerien lukumäärää. Luonnossa tavattavien spidroiinien ja niiden geenien koko on usein huomattavasti suurempi kuin tutkimuksissa.

Spidroiinien tuotto on haastavaa, koska isäntäsolut pyrkivät eroon spidroiinin geeniä ilmentävästä plasmidista induktion alettua. Tämä on seurausta spidroiinien geenien toistuvuudesta, suuresta koosta ja niiden ilmennyksestä aiheutuvista ongelmista ja taakasta, kuten kuvan 5 ilmennetyn vektorin kohdalla. Ongelmina ovat spidroiinien kertyminen solulimaan ja tiettyjen aminohappojen suuri kulutus. Erityisesti alaniinin, glysiinin ja proliinin suuri kulutus taas johtaa puutostilaan ja translaation terminointiin, jolloin solun elossapysymisen kannalta spidroiinien ilmennys ei ole enää mahdollista.



Kuva 5. Spidroiinin tuotantoon käytetty vektori, jossa on keltaisella merkittynä 96 monomeeriä spidroiinin geeniä. Muokattu lähteestä [16]

Gragi et al. ovat ehdottaneet, että korkea antibioottinen selektiivinen paine olisi mahdollisesti vaihtoehto ylläpitää tai kasvattaa spidroiinien ilmennystä erityisesti korkeatiheyksisissä bioreaktoreissa. [8] Tämä ei kuitenkaan ole taloudellisesti järkevä vaihtoehto.

On kuitenkin havaittu, että induktiolämpötilalla on merkittävä vaikutus geenin ilmennykseen, spidroiinin saantoon ja plasmidia kantaviin soluihin. Yang et al. tutkivat bioreaktoreiden induktiolämpötilan muutoksen vaikutusta rekombinanttien spidroiinien saantoon korkeatiheyksisissä soluviljelmissä. Heidän tutkimustensa perusteella laskemalla induktiolämpötila 30 C°:sta 16 C°:seen saadaan 5–8-kertainen saanto

staattiseen 30 C°:n induktiolämpötilaan verrattuna. Syynä uskotaan olevan spidroiinin geenien suuresta koosta ja toistuvuudesta aiheutuva metabolinen taakka, jolloin alemmassa lämpötilassa solut kantavat ja ilmentävät spidroiinin geeniä sisältävää plasmidia kauemmin. Merkittävää oli myös tuotettavan spidroiinin suuri koko (201,6 kDa) suhteessa sen saantoon. Taulukkoon 1 on koottu tutkimuksia erilaisista rekombinanttisista spidroiineista vertailua varten. [20]

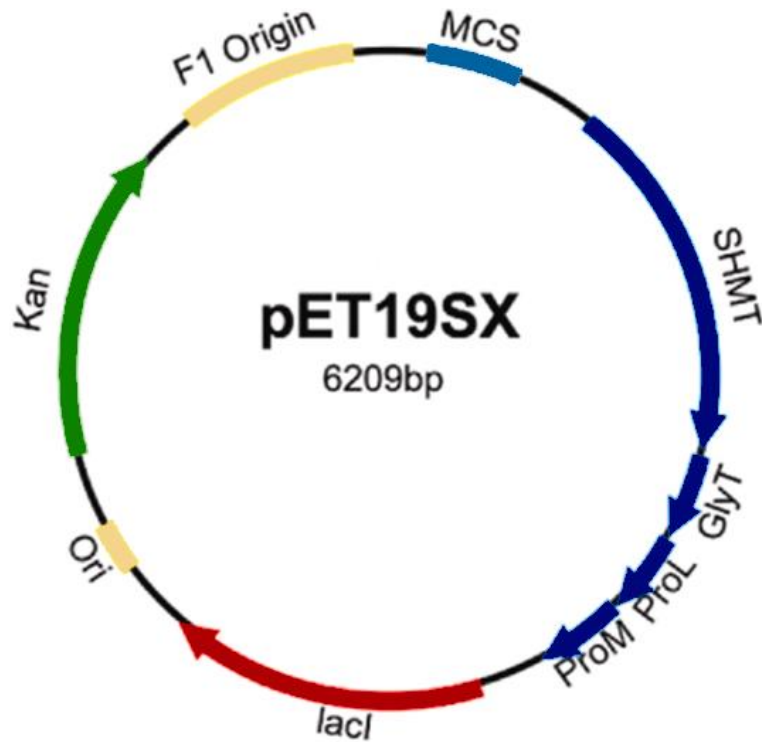
Taulukko 1. *Tietoja erilaisten rekombinanttisten spidroiinien tuotantoa käsittelevistä tutkimuksista*

Isäntäsolu	Proteiini	Meerejä (kpl)	Koko (kDa)	Tiitteri (l ⁻¹)	Lähde
<i>E. coli</i>	MaSp1	32	100,7	2,7 g	Xia et al. [19]
<i>E. coli</i>	MaSp2	64	201,6	3,6 g	Yang et al. [20]
<i>S. enterica</i>	ADF3	n.r.	56,2	256 mg	Azam et al. [22]
<i>C. glutamicum</i>	MaSp16	16	43,36	554,7 mg	Jin et al. [23]
	MaSp164	64	168,92	68 mg	
<i>E. coli</i>	NT2RepCT	2	33	20,9 g	Schmuck et al. [24]

Tutkimuksissa voidaan havaita käytettävän eniten *E. coli* -bakteeria sen edullisuuden, helpon muokattavuuden, laajan datan ja tehokkuuden vuoksi. *E. coli* -bakteerilla tehdyissä tutkimuksissa on myös saavutettu tähän mennessä suurimmat tiitterit. *S. enterica* tutkimuksessa esitettiin muun muassa gramnegatiivisten bakteerien tyyppin III eritysjärjestelmää (T3SS, type 3 secretion system), joka kuljettaa proteiineja molempien solukalvojen läpi [21]. T3SS:n tehokkuus perustuu siihen, että gramnegatiiviset bakteerit eivät eritä juurikaan proteiineja sen kautta ja käyttö ei siten vaikuta negatiivisesti solun kasvuun tai ylläpitoon. Eritys suoraan ympäröivään liuokseen T3SS:n avulla tuotti pitkiä rekombinanttisia spidroiineja, jotka pystyttiin eristämään helposti ja näin saatiin tuotettua yli 90 % puhdasta spidroiinia. Solulimaan tuottaessa puhtausaste vaihtelee 35–65 % välillä. T3SS:llä voidaan siis pienentää puhdistukseen kuluvia resursseja. [22]

Jin et al. tutkivat *C. glutamicum* -bakteerille vaihtoehtona *E. coli* -bakteerille, koska se on suhteellisen halpa, helposti muokattava ja teollisuudessa käytetty, eikä se eritä solunulkoisia proteolyyttejä tai tuota endotoksiineja. He raportoivat tiitterin MaSpl16:lle olevan 554,7 mg, mutta toteavat Coomassie-värijäyksen aliarvioivan tiitteriä heikon kiinnittyvyyden vuoksi noin neljännekseen todellisesta. Tällöin *C. glutamicum* olisi potentiaalinen kilpailija *E. coli* -bakteerille. [23] Huomioitavaa on myös proteiinin koko suhteessa saantoon, sillä Schmuck et al. raportoivat tiitteriksi huimat 20,9 g/l mutta proteiini on huomattavasti pienempi kuin muut.

Spidroiinien ilmennys kuluttaa huomattavia määriä glysiiniä, proliinia, alaniinia sekä proteiinisynteesissä tarvittavia molekyyliä kuten erilaisia tRNA:ita. Isäntäsolut eivät kuitenkaan pysty tuottamaan tarvittavaa määrää molekyyliä ja siten rajoittavat ja häiritsevät spidroiinien ilmennystä. Kasvattaakseen ilmennystä ja sen kautta mahdollista saantoa Xia et al. tutkivat soluproteiineja, joita isäntäsolut tuottivat rekombinanttisten spidroiinien ilmennyksen aikana. He löysivät spidroiinien tuotannon kasvattavan solun tarvetta seriini hydroksymetyylitransferaasille (SHMT) ja glycyl-tRNA synteasille. SHMT muuntaa seriinin glysiiniksi ja glycyl-tRNA synteasi katalysoi glycyl-tRNA:n synteesin spidroiinien tuotantoa varten. Glycyl-tRNA:n lisäksi on pyritty kasvattamaan isäntäsolujen proliini-tRNA, tRNA^{gly}, tRNA^{pro} ja tRNA^{ala} varastoja ilmentämällä *glyVXY*, *GlyT*, *ProL* ja *ProM* geenikasetteja esimerkiksi kuvan 6 kaltaisissa plasmideissa. Muita suoritettuja toimenpiteitä ovat myös kodonien optimointi, jolla vähennetään organismin kodonien rajoittunutta tai epätasaista käyttöä. Näiden muutosten avulla on saavutettu huomattavasti lupaavampia tuloksia suuremmissa rekombinanttisissa spidroiineissa. [8], [19], [20] Pieniä spidroiineja ilmentäessä kyseisten geenien liiallisella ilmennyksellä on havaittu olevan negatiivisia vaikutuksia saantoon. [23]



Kuva 6. Ilmennyysvektori, johon ei vielä ole liitetty spidroiinin geeniä. Muokattu lähteestä [8]

Rekombinanttisten spidroiinien tuotanto tapahtuu lähinnä panossyöttökasvatuksena sekoitusbioreaktoreissa. Panossyöttökasvatuksen etuna ovat erityisesti mikrobien kasvatus korkeatiheyksisinä viljelminä, spidroiinien suuri konsentraatio, mikrobien pidempi tuotanto- ja elinaika sekä induktion ja substraattien helppo kontrollointi. Induktion aloitus riippuu halutusta optisesta tiheydestä 600 nm aallonpituudella, mutta keskimäärin sen aloitus tapahtuu 10–15 tunnin kohdalla. Aloituksen jälkeinen kasvatusaika vaihtelee tutkimusten välillä huomattavasti. Kasvatusajat voivat vaihdella muutamasta tunnista useisiin kymmeneen tuntiin, mikä korreloi usein saannon kanssa. [8], [19], [23] Yang et al. saavuttivat suurelle spidroiinille tehokkaan, jopa 45 tunnin kasvatusajan. [20]

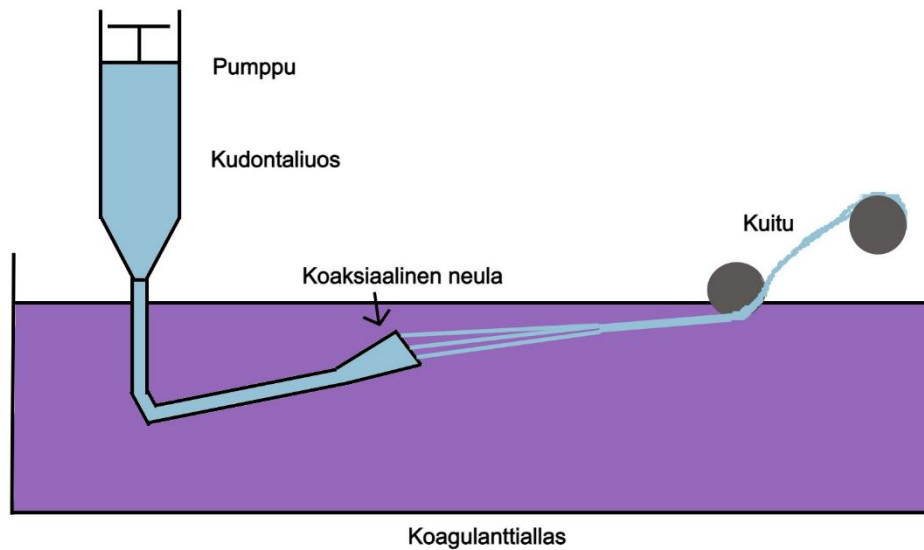
Fermentaatioissa isäntäsoluille syötetään glukoosia tai glyserolia hiilenlähteeksi, sillä ne ovat suhteellisen halpoja, yleisiä ja isäntäsoluille helposti käytettävissä [8], [19], [23]. Laktoosia ei käytetä, sillä isäntäsolut käyttävät ennemmin glukoosia ja yleensä indusoijana käytetään isopropyyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidi (IPTG), joka muistuttaa laktoosin metaboliittia ja *lacI* vaimentaja irroittautuisi operaattorista jo ennen haluttua solutiheyttä. Tästä seuraisi huomattavasti alhaisempi saanto. Useimmissa tutkimuksissa käytetään isäntäorganismina *E. coli* -bakteeria, jonka tehokas ilmennyssysteemi

perustuu erittäin tehokkaisiin T7 promoottoriin ja T7 RNA polymeraasiin. *LacI* veimentaa T7 promoottoria, jonka irrottautuminen aloittaa T7 RNA polymeraasin tuotannon, joka vuorostaan kiinnittyy ilmennysvektorin promoottoriin. Vaihtoehtoisia indusoijia voitaisiin etsiä ja siten kokeilla erilaisia substraatteja sekä säätelysysteemejä.

3.2 Keräys, puhdistus ja kudonta

Vaikka proteiinin monomeerejä saataisiin tuotettua organismissa, proteiini vielä pystyttävä puhdistamaan sitä ympäröivästä massasta. Puhdistus on tärkeä osa rekombinanttisten spidroiinien tuotantoa, sillä se on viimeinen spidroiinien lopullista saantoa rajoittava tekijä. Spidroiinien puhdistus ja keräysmenetelmät vaihtelevat tutkimusten välillä, riippuen muun muassa siitä erittääkö organismi proteiinia kummalle puolelle solukalvoa. [25] Solulimaan eritettävän proteiinin ongelmana ovat sen kertyminen solulimaan myrkyllisinä konsentraatioina sekä puhdistuksen vaikeus ja tehottomuus. Isäntäsolut, jotka erittävät spidroiineja suoraan kasvatusliuokseen ovat osoittautuneet tähän mennessä suotuisemmiksi vaihtoehdoiksi yksinkertaisemman puhdistuksen vuoksi.

Puhdistusta seuraa proteiinien kudonta kuiduksi. Geenien lisäksi kutomisprosessilla voidaan merkittävästi vaikuttaa valmiin kuidun ominaisuuksiin. Rekombinanttisten spidroiinien kutomista varten tutkijat ovat pyrkineet matkimaan hämähäkkien luontaista kutomisprosessia. Kutomisprosessi suoritetaan märkäkudontana kuidun muodostumiseen vaadittavien fysikaaliskemiallisten ilmiöiden takia. Spidroiinit voidaan liuottaa erilaisiin orgaanisiin liuottimiin, kuten ureaan ja hexafluoroisopropanoliin, estämään spidroiineille tyypillistä aggregoitumista eli kasautumista [24]. Kuvan 7 tavoin koagulantin ja koaksiaalisen neulan läpi kulkeva kudontaliuos saadaan saostettua liukenemattomaksi kuiduksi. [26]



Kuva 7. Yksinkertainen malli märkäkudonnasta.

Koaksiaalinen neula on polymeerien kudonnassa käytettävä neula, jonka avulla kudontaliuos muodostaa erillisiä säikeitä muodostaen yhdessä kuidun. Koaksiaalisella neulalla voidaan myös muokata kuidun rakennetta esimerkiksi ontoksi. Valmistettu kuitu ei kuitenkaan vastaa läheskään luonnollista hämähäkin silkkiä ilman jälkikäsittelyä. Jälkikäsittelyssä mekaanisten ominaisuuksien parantaminen saadaan aikaan venyttämällä kuituja moninkertaiseksi alkuperäiseen verrattuna. Du et al. ja Kim et al. ovat todenneet myös kelaamisnopeudella ja koaksiaalisen neulan sisemmällä halkaisijalla olevan vaikutus kuidun mekaanisiin ominaisuuksiin [27], [28].

Heidebrecht et al. mukaan luonnollisen kuidun mekaaniset ominaisuudet voidaan saavuttaa käyttämällä biomimeettistä kudontaliuosta. Biomimeettinen kudontaliuos matkii tarkemmin kuvassa 2 esitettyjä hämähäkkien silkkirauhasten fysikaalisia ja kemiallisia prosesseja. Sen seurauksena kudontaliuos saadaan faasieroteltua ja spidroiinit muodostavat misellejä korkeammassa konsentraatiossa [29]. Korkearakenteisten misellien muodostuminen on tärkeää, koska silloin valmiin kuidun mikrorakenne on mahdollisimman homogeeninen ja sisäiset jännitykset minimoituvat parantaen mekaanisia ominaisuuksia [17].

Suurimmalla osalla luonnollisista hämähäkinseiteistä ja spidroiineista keinotekoisesti valmistetuista kuiduista on epätoivottu ominaisuus kutistua ja kiertyä voimakkaasti, kun ne altistetaan kosteudelle. Greco et al. tutkivat eri aminohappojen vaikutusta kyseisiin ominaisuuksiin. Tulosten perusteella tyrosiinin muokkaaminen fenyylialaniiniksi vähentää kuitujen kutistumista ja liukoisuutta veteen. [30]

4. REKOMBINANTTISTEN SPIDROIINIEN SOVELLUKSET

Luonnossa tavattavan hämähäkinseinin varhaisia moderneja sovelluksia ovat olleet mm. käsin kerätystä seitistä valmistettu kultaisen sävyinen kaapu, teleskooppiristikot ja viulun kielet. Nykyisin koodattavaa geeniä muokkaamalla spidroiineja voidaan muovata erilaisiin käyttökohteisiin. Potentiaalisia käyttökohteita on lukuisia ja teollisessa mittakaavassa käytössä olevia kohteita on muutamia. Erilaiset spidroiinit sopivat toisiin sovelluksiin paremmin kuin toiset ja siksi kaikkia spidroiineja ei sovelleta kaikkiin teollisuuden osa-alueisiin. Spidroiineja kehittäville ja tuottaville yrityksillä on tapana tehdä yhteistyötä suurten yhtiöiden kanssa saadakseen näkyvyyttä. Yritykset myös pitävät yksityiskohtaisemmat tiedot valmistuksesta, rakenteesta ja geeneistä itsellään, jonka vuoksi niiden tutkiminen tai tiedon löytäminen on haastavaa.

4.1 Markkinoilla olevat sovellukset

BIOSTEEL® on Münchenissä, Saksassa sijaitsevan AMSilk:in rekisteröimä tavaramerkki, joka rakentuu *A. diadematus* -hämähäkki lajin MaSp1 ja MaSp2:sta. Niitä tuottaa geenimuokattu *E. coli*-kanta. Suurimpia julkisia yhteistyökumppaneita ovat AIRBUS ja ADIDAS, joille AMSilk kehittää vastaavasti lentokoneen siipiä ja jouksukenkiä. Muita kyseisen yrityksen tuotteita ovat silkkigeeli ja silkkihelmet kosmetiikkaan sekä BioShield-S1 lääkinällisiin implanteihin. [31]

Yhdysvaltalainen Bolt Threads on kehittänyt geenimuunnellun hiivan tuottamaan *Argiope bruennichi*-lajin MaSp2:sta. Yritys kutoo Microsilk™-nimisestä kuidusta kangasta ja vaatteita. Sen uusin luomus on yhteistyössä ADIDAS:in ja Stella McCartneyn kanssa kehitetty naisten tennismekko. Bolt Threads on kehitellyt myös b-silk™-nimisen proteiinin korvatakseen silikonin ja keratiinin ihon ja hiustenhoitotuotteissa. [31]

Spiber niminen yritys on luonut Japanissa eri hämähäkkilajien MaSp:sta ja Flag:ista mikro-organismeja geenimuokkaamalla ja fermentoimalla synteettistä kuitua QMONOS™:ta. Kyseisen kuidun väitetään olevan erittäin kevyttä, jopa 4–5 kertaa vahvempaa kuin teräs ja joustavampaa kuin nylon. Spiber:in ensimmäisiä tuotteita on QMONOS™-kuidusta Goldwin:in kanssa yhteistyössä valmistettu Moon Parka -takki. [31] Aluksi ongelmana QMONOS™-kuidussa oli sen tapa kutistua erittäin voimakkaasti,

mutta Spiber väittää löytäneensä hämähäkinseitän geeneistä osan, joka aiheuttaa voimakkaan supistumisen ja poistaneensa sen. [32]

Spidroiinit ovat vielä itsessään kehittämisen tarpeessa kuten myös niiden potentiaaliset sovellukset. Kehitteillä olevia sovelluksia ovat lähinnä erittäin täsmälliset ja monimutkaiset sovellukset kuten spidroiinipohjainen uranyyliä sitova proteiini (SUP), kudoksen uusiutumista nopeuttava skaffoldi ja terapeuttisten molekyylien kantaminen [33]–[35]. Rekombinanttisesti tuotettuja spidroiineja voidaan käyttää myös kimeerisissä molekyyliissä ja komposiittien tai hybridien rakenneosina.

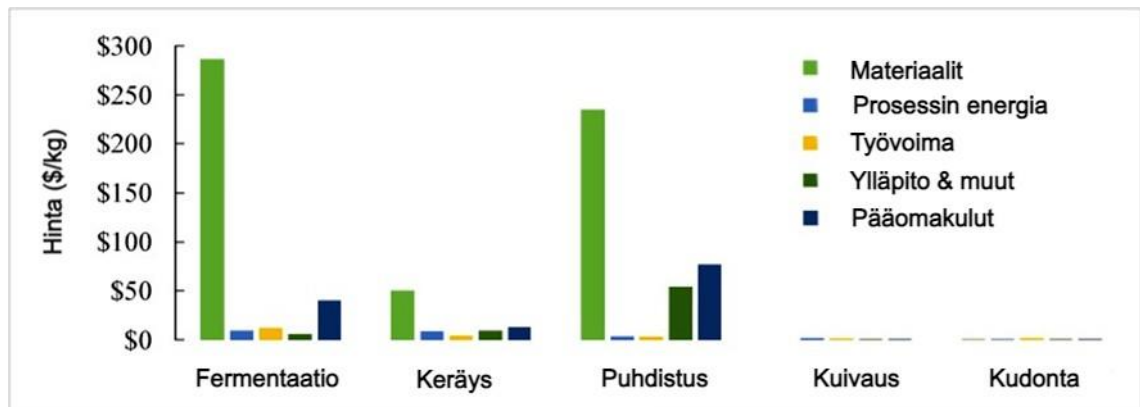
4.2 Teollisen mittakaavan tuotanto

Päästäkseen markkinoille ja tavallisten ihmisten ulottuville täytyy rekombinanttisten spidroiinien tuotanto saada kannattavalle tasolle. Valitettavasti edellä mainittujen yritysten tuloksia ja toimintaa ei voida tarkemmin huomioida yrityssalaisuuksista johtuen. Ekonomista toteutettavuutta ja ympäristövaikutuksia tutkineet Edlund et al. kehittivät kaksi skenaariota rekombinanttisista spidroiineista *E. coli* -bakteerilla valmistetuille kuiduille. Pioneeri skenaario vastaa vuoden 2017 teollista tuotantoa, tutkimustuloksia ja hintoja. Optimoitu versio vastaa tutkimuksen tekohetkellä saatavilla olleeseen dataan perustuvaa näkemystä tehtaasta, jonka prosesseja on optimoitu. Tehdasasetelmat on listattu taulukossa 2. [36]

Taulukko 2. *Edlund et al. tekemän selvityksen mukainen asetelma rekombinanttista spidroiinia tuottavasta tehtaasta. Muokattu lähteestä [36]*

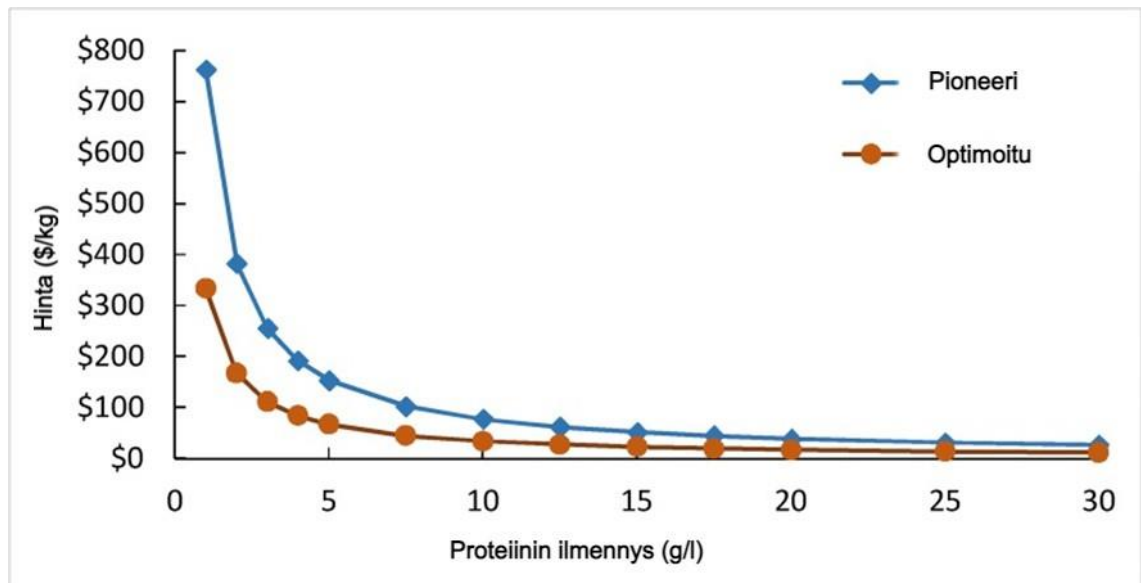
	Pioneeri	Optimoitu
Proteiinin ilmennys (g/l)	1	10
Tehtaan numero	1	17
Minimaalinen kasvatusliuos	Ei	Kyllä
Glyseroli ravinteena	Ei	Kyllä
Lämpöinduktio	Ei	Kyllä
Ensimmäisen sentrifugoinnin ohitus	Ei	Kyllä
Flokkaus	Ei	Kyllä
Kuivaus	Kyllä	Ei

Tehtaan perustamiskustannukset ovat molemmissa skenaarioissa 314 miljoonaa \$USD sisältäen materiaalit, rakentamisen työvoiman sekä muut tehtaan käynnistystä ja valmistusta koskevat kulut. Pioneerin tapauksessa toimintakustannuksiksi vuodessa arvioitiin 223 miljoonaa \$USD ja 350 tonnia vuotuiseksi tuotantomääräksi. Heidän laskelmiensa mukaan silkin kilohinnaksi muodostuisi 761 \$USD per kg spidroiinista valmistettua kuitua. Kuvista 8 ja 9 nähdään korkean kilohinnan syntyvän materiaali- ja käyttökustannuksista ja alhaisesta geenin ilmennyksestä. Fermentaation materiaalikuluista 67 % koostuu pelkästään indusoija IPTG:stä, 16 % glukoosista ja merkittävä osuus antibiooteista. Kromatografisessa puhdistuksessa suuret puhdistustilavuudet vaativat myös suuria määriä nikkelisulfaattia ja NTA helmiä (42 % ja 23 % materiaalikustannuksista), jotka nostavat kilohintaa huomattavasti. [36]



Kuva 8. Pioneeritehtaassa rekombinanttisten spidroiinien kilohinnan muodostuminen valmistusprosessin eri osissa. Muokattu lähteestä [36].

Optimoidussa versiossa Edlund et al. huomioivat taulukon 2 muutokset ja laskivat niiden vaikutuksen kilohintaan. Muutoksilla saatu 3550 tonnin vuosituotanto laski kilohintaa 97 % eli 23 \$USD asti. Tärkeimpiä tehtäviä muutoksia ovat ilmennyksen kasvatus, indusoijan mahdollinen vaihtaminen ja puhdistusmenetelmien muuttaminen. Geenin ilmennyksen kasvattamisella saatava tuotannon kymmenkertaistuminen nostaisi käyttökustannuksia vain vajaan prosentin. Kuvassa 9 on esitetty molempien tehdasetelmien tuottaman proteiinin kilohinnan muutos geenin ilmennyksen funktiona. Kyseisestä kuvasta voidaan havaita, kuinka tärkeää olisi saada geenin ilmennys vähintään 10 g/l, jotta tuotanto ja sovellukset olisivat suhteellisen kannattavia.



Kuva 9. Rekombinanttisen spidroinin kilohinta proteiinin ilmennyksen funktiona eri tehdasasetelmissä. Muokattu lähteestä [36].

Toinen optimoinnin ja kehityksen tarpeessa oleva tekijä spidroinien tuotannossa on ympäristövaikutukset. Alhaisella tiitterillä kilogramma kohtaiset päästöt ovat huomattavat, jopa $572 \text{ kgCO}_{2\text{eq}}/\text{kg}$. Tiitterin nostaminen on Edlund et al. mukaan edellytys alentaa päästöjä kilogrammaa spidroineja kohden teollisessa mittakaavassa. Myös tuotannon materiaalien ja energian sivuvirtojen hyötykäyttö vähentää päästöjä hieman. Nämä toimenpiteet eivät kuitenkaan riitä laskemaan päästöekvivalenttia muiden kuitujen tasolle. Monet materiaalit tuottavat vain $1\text{--}2 \text{ kgCO}_{2\text{eq}}/\text{kg}$, kun taas spidroinit tuottavat Edlund et al. suorittamien arvioiden perusteella vähintään $55 \text{ kgCO}_{2\text{eq}}/\text{kg}$. [36]

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Spidroiineja voidaan tuottaa rekombinanttisesti erilaisissa mikrobeissa. Rekombinanttisten spidroiinien tuotannon pääasiallisia ongelmia ovat aiheen uutuus ja alhainen saanto suhteessa geenien kokoon ja mekaanisiin ominaisuuksiin. Huomattavia edistysaskelia on kuitenkin tehty erityisesti viimeisen kymmenen vuoden aikana. Laskemalla induktiolämpötila 16 C°:seen mikrobit kantavat plasmideja pidempään ja tuottavat enemmän spidroiineja. Kasvatettu aminohappojen ilmennys ja saatavuus vähentävät huomattavasti translaation aikaisia virheitä ja keskeytyksiä. Glyserolin ja minimaalisen kasvatusliuoksen käytöllä voitaisiin optimoida fermentaatiota. *E. coli* on osoittautunut tehokkaimmaksi ja parhaaksi isäntäorganismiksi, mutta *C. glutamicum* on mahdollinen vaihtoehto. Optimoimalla myös fermentaation jälkeiset tuotannon vaiheet voidaan saavuttaa enemmän ja korkealaatuisempia kuituja. Näitä menetelmiä voisivat olla biomimeettinen kudonta, flokkaus ja ensimmäisen sentrifugoinnin sekä kuivauksen tekemättä jättäminen.

Vaikka teollisen mittakaavan sovelluksia on jo muutamia nämä sovelluskohteet rajautuvat pääasiassa perinteisiin sovelluksiin kuten vaateteollisuuteen. Useat monimutkaisemmat sovelluskohteet esimerkiksi lääketieteessä ovat vasta kehityksessä. Lähitulevaisuudessa voitaisiin nähdä spidroiinien teollisen mittakaavan sovelluskohteiden laajeneminen, jonka vuoksi niiden tutkiminen ja kehittäminen edelleen on tärkeää.

Taloudellisesti rekombinanttisten spidroiinien tuotanto on nykyhetkellä suhteellisen kallista. Rekombinanttisen spidroiinin kilohinta on vielä huomattavasti korkeammalla kuin muiden vastaavien kuitujen. Teollisen mittakaavan tuotanto vuoden 2017 infrastruktuurilla tuotti noin 572 kgCO_{2eq}/kg ja mikäli tuotantoa saadaan optimoitua, voidaan saavuttaa 55 kgCO_{2eq}/kg. Tämä on kuitenkin huomattava määrä päästöjä verrattuna muihin ohuisiin kuitumaisiin polymeereihin, joiden päästöt ovat 1–2 kgCO_{2eq}/kg. Saavuttaakseen laajemmat markkinat täytyy rekombinanttisten spidroiinien tuotantoa kehittää erityisesti saannon kasvattamiseksi ja teollisten prosessien materiaalien ja kemikaalien kulujen sekä päästöjen alentamiseksi.

LÄHTEET

- [1] J. G. Hardy and T. R. Scheibel, "Production and processing of spider silk proteins," *J Polym Sci A Polym Chem*, vol. 47, no. 16, pp. 3957–3963, Aug. 2009, doi: 10.1002/pola.23484.
- [2] I. Agnarsson, M. Kuntner, and T. A. Blackledge, "Bioprospecting Finds the Toughest Biological Material: Extraordinary Silk from a Giant Riverine Orb Spider," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e11234, Sep. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0011234.
- [3] Y. Tachibana *et al.*, "Environmental biodegradability of recombinant structural protein," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, p. 242, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-020-80114-6.
- [4] L. Eisoldt, A. Smith, and T. Scheibel, "Decoding the secrets of spider silk," *Materials Today*, vol. 14, no. 3, pp. 80–86, Mar. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70057-8.
- [5] S. Fruergaard, M. B. Lund, A. Schramm, T. Vosegaard, and T. Bilde, "The myth of antibiotic spider silk," *iScience*, vol. 24, no. 10, p. 103125, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.isci.2021.103125.
- [6] Mark J. Bonino, "Material properties of spider silk," Masters thesis, University of Rochester, Rochester, NY, 2003. Accessed: Apr. 15, 2022. [Online]. Available: <https://www.ile.rochester.edu/media/publications/documents/theses/Bonino.pdf>
- [7] N. A. Ayoub, J. E. Garb, A. Kuelbs, and C. Y. Hayashi, "Ancient Properties of Spider Silks Revealed by the Complete Gene Sequence of the Prey-Wrapping Silk Protein (AcSp1)," *Mol Biol Evol*, vol. 30, no. 3, pp. 589–601, Mar. 2013, doi: 10.1093/molbev/mss254.
- [8] G. Bhattacharyya *et al.*, "Large scale production of synthetic spider silk proteins in *Escherichia coli*," *Protein Expr Purif*, vol. 183, p. 105839, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.pep.2021.105839.
- [9] "Spider silk." https://en.wikipedia.org/wiki/Spider_silk (accessed Jan. 21, 2023).
- [10] C. Y. Hayashi, N. H. Shipley, and R. v. Lewis, "Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins," *Int J Biol Macromol*, vol. 24, no. 2–3, pp. 271–275, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0141-8130(98)00089-0.
- [11] T. Scheibel, "Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins.," *Microb Cell Fact*, vol. 3, no. 1, p. 14, 2004, doi: 10.1186/1475-2859-3-14.
- [12] A. D. Malay, K. Arakawa, and K. Numata, "Analysis of repetitive amino acid motifs reveals the essential features of spider dragline silk proteins," *PLoS One*, vol. 12, no. 8, p. e0183397, Aug. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0183397.
- [13] J. Guan, W. Zhu, B. Liu, K. Yang, F. Vollrath, and J. Xu, "Comparing the microstructure and mechanical properties of *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi* cocoon composites," *Acta Biomater*, vol. 47, pp. 60–70, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2016.09.042.
- [14] M. Cheng, W. Chen, and T. Weerasooriya, "Mechanical Properties of Kevlar KM2 Single Fiber," *J Eng Mater Technol*, vol. 127, no. 2, pp. 197–203, 2005, doi: 10.1115/1.1857937.
- [15] J. William D. Callister and D. G. Rethwisch, *Callister's Materials Science and Engineering*. Wiley-Blackwell, 2020.
- [16] C. H. Bowen *et al.*, "Recombinant Spidroins Fully Replicate Primary Mechanical Properties of Natural Spider Silk," *Biomacromolecules*, vol. 19, no. 9, pp. 3853–3860, Sep. 2018, doi: 10.1021/acs.biomac.8b00980.
- [17] C. Thamm and T. Scheibel, "Recombinant Production, Characterization, and Fiber Spinning of an Engineered Short Major Ampullate Spidroin (MaSp1s)," *Biomacromolecules*, vol. 18, no. 4, pp. 1365–1372, Apr. 2017, doi: 10.1021/acs.biomac.7b00090.
- [18] D. M. de C. Bittencourt, P. Oliveira, V. A. Michalczechen-Lacerda, G. M. S. Rosinha, J. A. Jones, and E. L. Rech, "Bioengineering of spider silks for the production of biomedical materials," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, pp. 958486–958486, 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.958486.
- [19] X.-X. Xia, Z.-G. Qian, C. S. Ki, Y. H. Park, D. L. Kaplan, and S. Y. Lee, "Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 32, pp. 14059–14063, Aug. 2010, doi: 10.1073/pnas.1003366107.

- [20] Y.-X. Yang, Z.-G. Qian, J.-J. Zhong, and X.-X. Xia, "Hyper-production of large proteins of spider dragline silk MaSp2 by *Escherichia coli* via synthetic biology approach," *Process Biochemistry*, vol. 51, no. 4, pp. 484–490, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.procbio.2016.01.006.
- [21] D. M. Widmaier *et al.*, "Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers," *Mol Syst Biol*, vol. 5, no. 1, p. 309, Jan. 2009, doi: 10.1038/msb.2009.62.
- [22] A. Azam, C. Li, K. J. Metcalf, and D. Tullman-Ercek, "Type III secretion as a generalizable strategy for the production of full-length biopolymer-forming proteins," *Biotechnol Bioeng*, vol. 113, no. 11, pp. 2313–2320, Nov. 2016, doi: 10.1002/bit.25656.
- [23] Q. Jin, F. Pan, C.-F. Hu, S. Y. Lee, X.-X. Xia, and Z.-G. Qian, "Secretory production of spider silk proteins in metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for spinning into tough fibers," *Metab Eng*, vol. 70, pp. 102–114, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.ymben.2022.01.009.
- [24] B. Schmuck, G. Greco, A. Barth, N. M. Pugno, J. Johansson, and A. Rising, "High-yield production of a super-soluble miniature spidroin for biomimetic high-performance materials," *Materials Today*, vol. 50, pp. 16–23, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.mattod.2021.07.020.
- [25] D. R. Whittall, K. v. Baker, R. Breitling, and E. Takano, "Host Systems for the Production of Recombinant Spider Silk," *Trends Biotechnol*, vol. 39, no. 6, pp. 560–573, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.09.007.
- [26] A. Koepfel and C. Holland, "Progress and Trends in Artificial Silk Spinning: A Systematic Review," *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 3, no. 3, pp. 226–237, Mar. 2017, doi: 10.1021/acsbio.2016.00669.
- [27] N. Du, X. Y. Liu, J. Narayanan, L. Li, M. L. M. Lim, and D. Li, "Design of Superior Spider Silk: From Nanostructure to Mechanical Properties," *Biophys J*, vol. 91, no. 12, pp. 4528–4535, Dec. 2006, doi: 10.1529/biophysj.106.089144.
- [28] H. C. Kim, D. Kim, J. Y. Lee, L. Zhai, and J. Kim, "Effect of Wet Spinning and Stretching to Enhance Mechanical Properties of Cellulose Nanofiber Filament," *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology*, vol. 6, no. 3, pp. 567–575, Jul. 2019, doi: 10.1007/s40684-019-00070-z.
- [29] A. Heidebrecht *et al.*, "Biomimetic Fibers Made of Recombinant Spidroins with the Same Toughness as Natural Spider Silk," *Advanced Materials*, vol. 27, no. 13, pp. 2189–2194, Apr. 2015, doi: 10.1002/adma.201404234.
- [30] G. Greco *et al.*, "Tyrosine residues mediate supercontraction in biomimetic spider silk," *Commun Mater*, vol. 2, no. 1, p. 43, Dec. 2021, doi: 10.1038/s43246-021-00147-w.
- [31] M. Saric and T. Scheibel, "Engineering of silk proteins for materials applications," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 60, pp. 213–220, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.copbio.2019.05.005.
- [32] Spiber, "Product Sales." Accessed: May 20, 2022. [Online]. Available: https://spiber.inc/wp-content/themes/spiber/assets/MP%20press%20release%20_ENG.pdf
- [33] Y. Yuan *et al.*, "Ultrafast and Highly Selective Uranium Extraction from Seawater by Hydrogel-like Spidroin-based Protein Fiber," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 58, no. 34, pp. 11785–11790, Aug. 2019, doi: 10.1002/anie.201906191.
- [34] M. M. Moisenovich *et al.*, "Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds," *Biomaterials*, vol. 33, no. 15, pp. 3887–3898, May 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.013.
- [35] A. Florczak, I. Grzechowiak, T. Deptuch, K. Kucharczyk, A. Kaminska, and H. Dams-Kozłowska, "Silk Particles as Carriers of Therapeutic Molecules for Cancer Treatment," *Materials*, vol. 13, no. 21, p. 4946, Nov. 2020, doi: 10.3390/ma13214946.
- [36] A. M. Edlund, J. Jones, R. Lewis, and J. C. Quinn, "Economic feasibility and environmental impact of synthetic spider silk production from *Escherichia coli*," *N Biotechnol*, vol. 42, pp. 12–18, May 2018, doi: 10.1016/j.nbt.2017.12.006.